

Aus dem Pharmakologischen Institut  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

---

**Einfluß von Cumarinderivaten auf die Aktivität  
mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,  
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von  
**Gabriele Mels**  
aus Erfurt

Mainz 1973

---



Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes-  
Gutenberg-Universität Mainz

Einfluß von Cumarinderivaten auf die Aktivität  
mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde der Jo-  
hannes-Gutenberg-Universität Mainz, den Medizinischen  
Fachbereichen

vorgelegt von

Gabriele Meis

aus Erfurt

M a i n z 1973



Fachbereichsdekan: Professor Dr. U. Wollert

Referent: Professor Dr. G.F. Kahl

Korreferent: Professor Dr. K.J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1973

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

|                                                                                        | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| EINLEITUNG                                                                             | 1     |
| Ziel der Arbeit                                                                        | 9     |
| MATERIAL UND METHODEN                                                                  | 12    |
| 1. Pufferlösungen                                                                      | 12    |
| 2. Substanzen                                                                          | 12    |
| 3. Geräte                                                                              | 12    |
| 4. Mikrosomenpräparation                                                               | 13    |
| 5. Eiweißbestimmung nach Lowry                                                         | 14    |
| 6. NADPH-regenerierendes System<br>und $\text{NADP}^+$                                 | 15    |
| 7. p-Nitroanisoldemethylierung                                                         | 15    |
| 8. Amidopyrindemethylierung                                                            | 17    |
| 9. Anilinhydroxylierung                                                                | 19    |
| 10. Versuchsanordnung und statisti-<br>sche Auswertung                                 | 21    |
| ERGEBNISSE                                                                             | 22    |
| 1. Aktivität der p-Nitroanisol-<br>demethylierung in Gegenwart von<br>Cumarinderivaten | 22    |
| 2. Aktivität der Amidopyrindemethy-<br>lierung in Gegenwart von<br>Cumarinderivaten    | 27    |
| 3. Aktivität der Anilinhydroxylie-<br>rung in Gegenwart von Cumarin-<br>derivaten      | 29    |
| 4. Zusammenfassung der Ergebnisse<br>der Versuchsreihen                                | 31    |
| DISKUSSION                                                                             | 32    |
| ZUSAMMENFASSUNG                                                                        | 38    |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                                   | 39    |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## E I N L E I T U N G

Jeder Organismus setzt sich täglich mit körperfremden Substanzen auseinander. Viele Fremdstoffe werden unverändert wieder ausgeschieden. Andere Substanzen werden chemisch verändert und können dadurch besser wasserlöslich werden, wodurch ihre Ausscheidung beschleunigt wird.

Das gilt auch für die Arzneimittel, die meistens gut lipoidlösliche Substanzen sind. Die Senkung der Lipoidlöslichkeit führt dazu, daß die Substanzen schwerer in die Zellen eindringen können und sie damit weniger toxisch werden.

Zunächst ist es interessant, auf die verschiedenen Möglichkeiten einzugehen, die der Organismus hat, um Substanzen zu verändern. Dabei ist zu berücksichtigen, daß neben einer Entgiftung von Fremdsubstanzen der Umbau körperfremder Substanzen auch zu einer "Giftung" eines vorher weniger wirksamen Stoffes führen kann. Aus einer Reihe von Beispielen sei das Anilin herausgegriffen. Aus ihm entwickelt sich in geringen Mengen Phenylhydroxylamin, das die Oxydation von Hämoglobin in Methämoglobin katalysiert und dadurch zu den bekannten Vergiftungen durch anilinhaltige Wäschestempel führt (Kiese, 1959).

Der Fremdstoffumbau geht in der Regel in zwei Schritten vonstatten. Zunächst kommt es zu einer Veränderung des Arzneimittelmoleküls, dann schließt sich eine Koppelung an eine körpereigene Substanz an, die zu einer weiteren Verbesserung der Ausscheidungsfähigkeit führt. Der erste Schritt, die Veränderung des Arzneimittelmoleküls, kann auf verschiedenen enzymatischen Wegen erfolgen. Es kommen oxidative, reduktive und hydrolytische Prozesse vor.

Die quantitativ größte Rolle spielen die oxidativen Vorgänge. Sie finden in verschiedenen Organen, von denen die Leber das wichtigste ist, in einer partikulären Fraktion statt, die man Mikrosomen nennt (Brodie et al., 1953).

Es ist vielleicht interessant, zu erwähnen, daß Mikrosomen keine anatomisch genau charakterisierten Partikel darstellen, sondern durch die Homogenisierung entstandene Trümmer des endoplasmatischen Retikulums. Sie sind definiert durch ihr Verhalten im Schwerfeld der Zentrifuge und ihre speziellen biologischen Leistungen. Sie sind Sitz wichtiger Enzyme der Proteinsynthese (Raacke, 1961), außerdem enthalten sie ein Atmungssystem, das von der üblichen in Mitochondrien lokalisierten Atmungskette abweicht. Zur Katalyse von Hydroxylierungsreaktionen benötigen sie NADPH, d.h. aktivierten Wasserstoff, und Sauerstoff (Gillette et al., 1957).

Daraus kann man schließen, daß NADPH seine Elektronen über ein Enzymsystem an den Sauerstoff abgibt. Es handelt sich hier um "mischfunktionelle Oxydasen" im Sinne von Mason (1957). Von zwei Atomen eines Sauerstoffmoleküls wird durch sie eines zu Wasser reduziert, das andere als Hydroxylgruppe in ein Arzneimittel bzw. in einen von diesem abgespaltenen Rest eingebaut. Das Elektronentransportsystem, das an diesem Vorgang beteiligt ist, enthält auf der NADPH-Seite die NADPH-Cytochrom c-Reduktase, ein Flavoprotein, über das der Wasserstoff des NADPH in das System eingebracht wird, auf der Sauerstoffseite das Cytochrom P-450, eine Hämverbindung, deren Eisen aus dem zweiwertigen in den dreiwertigen Zustand und umgekehrt übergehen kann (Omura et al., 1966).

So befindet sich dieses Cytochrom in einem ständigen Reduktions-Oxydationszyklus, in dessen Verlauf die

Fremdstoffe unter Ausprägung charakteristischer spektraler Erscheinungen gebunden (Remmer et al., 1966), oxydiert und wieder abgespalten werden. Kohlenmonoxid vermag diesen Zyklus zu unterbrechen, denn es bildet mit dem reduzierten Cytochrom eine stabile Verbindung, die nicht wieder oxidiert werden kann (Cooper et al., 1965). Diese Verbindung hat eine Lichtabsorption, die bei 450 nm besonders ausgeprägt ist und der das Cytochrom P-450 seinen Namen verdankt (Omura und Sato, 1962).

Die Substrate dieser mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase gehören den verschiedensten chemischen Gruppen an. Sehr leicht werden Fremdstoffe, die einfache oder kondensierte aromatische Ringe enthalten, hydroxyliert, z.B. Acetanilid (Mitoma et al., 1956). Meist handelt es sich um p-Hydroxyverbindungen. Eine weitere Möglichkeit ist die Seitenkettenhydroxylierung, wie sie bei den Barbituraten durchgeführt wird (Winters et al., 1955). Häufig kommen auch oxidative Desalkylierungen vor, z.B. N-De-methylierung von Amidopyrin (Brodie und Axelrod, 1950).

Reduktionen sind im Organismus ebenfalls möglich. Am häufigsten werden Azoverbindungen gespalten. Das klassische Beispiel ist die Spaltung von Prontosil<sup>R</sup> in Sulfanilamid und Triaminobenzol (Tréfouel et al., 1960).

Als letztes sollte noch auf die Möglichkeit der Hydrolyse hingewiesen werden. Sowohl Ester als auch Säureamide werden unter Wasseranlagerung gespalten. So wird z.B. Procain in p-Aminobenzoessäure und Diäthylaminoäthanol gespalten, die Reaktion wird durch Esterasen katalysiert, die ubiquitär im Gewebe und Plasma vorkommen (Kalow, 1952).

Der zweite Schritt im Arzneimittelstoffwechsel besteht in synthetischen Reaktionen, d.h. der Konjugation von meist zuvor oxidierten körperfremden Substanzen mit anderen Molekülen. Meist kommt die Kopplung an Glucuronsäure vor, z.B. bei Chlorpromazin (Huang et al., 1961). Die Substanzen, die gekoppelt werden, enthalten oft phenolische oder alkoholische Hydroxylgruppen. Körpereigene Substanzen, z.B. Bilirubin und Steroidhormone, werden ebenfalls glucuronidiert (Billing und Lathe, 1956; Isselbacher, 1956).

Weitere Möglichkeiten der Konjugation bestehen in der Kopplung an Sulfat und Aminosäuren, z.B. an Glykokoll, sowie in einer Methylierung oder einer Acetylierung (Netter, 1962).

Bei allen diesen synthetischen Stoffwechselreaktionen von Arzneimitteln spielt die vorherige Aktivierung der zu übertragenden Reste oder des zu inaktivierenden Stoffes selber eine entscheidende Rolle. Die Aktivierungen sind energieverbrauchende Prozesse (Netter, 1962).

Eine Reihe von Faktoren kann Einfluß auf die arzneimittelabbauenden Fermente nehmen. So zeigte sich, daß bei alloxandiabetischen Ratten die Fähigkeit, Hexobarbital zu hydroxylieren, Codein zu demethylieren und Chlorpromazin zu sulfoxidieren, herabgesetzt ist (Dixon et al., 1961), ein Effekt, der sich in vivo durch Gaben von Insulin wiederaufheben läßt. Man vermutet, daß der Glykogengehalt der Leberzellen etwas mit der arzneimittelumbauenden Aktivität der Mikrosomen zu tun hat; eine Ansicht, die man an Hand von hungerversuchen bei Ratten zu bestätigen sucht (Dixon et al., 1960).

Eine weitere Beobachtung ist bei Neugeborenen gemacht worden, deren Enzymaktivität entschieden verringert ist. Davon ist z.B. die Glucuronyltransferase betroffen (Brown et al., 1958). Die daraus resultierende mangelnde Fähigkeit zu glucuronidieren erklärt die hohe Toxizität von Chloramphenicol bei Säuglingen. Ein weiteres Beispiel ist die Hydroxylierung von Fremdstoffen. Auch diese Fähigkeit entwickelt sich erst nach der Geburt. Meerschweinchen können Hexobarbital erst im Alter von etwa vier Wochen in dem gleichen Maße abbauen wie erwachsene Tiere (Jondorf et al., 1958).

Zu erörtern ist auch die Möglichkeit, daß der Abbau körperfremder Substanzen beeinflußt werden kann durch andere körperfremde Substanzen. Es gibt zwei Richtungen, in denen eine Verbindung den Stoffwechsel einer anderen beeinflussen kann: im Sinne einer Beschleunigung und im Sinne einer Hemmung. So beschleunigen z.B. 3,4-Benzpyren und andere zyklische Kohlenwasserstoffe die Hydroxylierung einiger Substanzen in vivo (Conney et al., 1956).

Schon 1959 wurde gezeigt, daß außer den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen auch Phenobarbital eine Stimulierung der Lebermikrosomen hervorruft (Kemmer, 1959). An Phenobarbital gewöhnte Ratten inaktivieren Hexobarbital drei- bis zehnmal schneller als Kontrolltiere. Der Mechanismus dieser Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer adaptiven Eiweiß- und Enzymvermehrung (Conney et al., 1960). Unter Phenobarbitaleinwirkung kommt es zu einer Vermehrung des Lebereiweißes und des Mikrosomenproteins, ein Vorgang, der durch Äthionin, das die Proteinsynthese stört, unterbunden wird. Dieser Stimulierungsvorgang wird als Enzyminduktion

bezeichnet. In den letzten Jahren sind mehr als 200 Fremdstoffe, unter ihnen zahlreiche Arzneimittel, bekanntgeworden, die einen induzierenden Einfluß auf die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums ausüben (Committee on problems of drug safety of the drug research board, 1969). Auch am Menschen ist die Wirkung von Enzyminduktoren häufig nachgewiesen worden (Conney, 1969).

Eine Hemmung des Abbaues eines Arzneimittels durch ein anderes Arzneimittel kann auf verschiedene Weise zustande kommen. Die eine hemmende Interaktionsart zweier Fremdstoffen untereinander ist die Verdrängungshemmung oder kompetitive Hemmung: d.h., daß der eine Fremdstoff von einem chemisch oft verwandten Stoff vom Ort des Abbaues, also von der Enzymoberfläche, verdrängt wird, z.B. die hydrolytische Spaltung von Procain an der Cholinesterase, die durch eine Reihe anderer Ester gehemmt wird (Netter, 1959).

Eine andere Art der Hemmung ist die nichtkompetitive Hemmung. Darunter versteht man, daß der hemmende Fremdstoff nicht an der gleichen katalytischen Stelle des Enzyms gebunden sein muß wie der abzubauende, aber das Enzym blockiert. Er reagiert z.B. mit den SH-Gruppen des Enzyms oder phosphoryliert es. Bekannt ist die Hemmung des Äthanolabbaues auf der Stufe des Acetaldehydes durch Disulfiram. (Graham, 1956).

Neben den hier als Beispiel genannten Substanzen haben noch viele einen hemmenden oder stimulierenden Effekt auf den Arzneimittelstoffwechsel, der zum Teil auch beim Menschen nachgewiesen wurde (MacDonald und Robinson, 1968). Deshalb muß man damit rechnen, daß therapeutisch gegebene Pharmaka ihren Stoffwechsel gegenseitig beeinflussen. Damit wird in vielen Fällen die Kontrolle über die Wirkung erschwert.

Diese Überlegungen führten uns zu der experimentellen Fragestellung, ob Cumarinderivate andere Pharmaka in ihrem Abbau stören.

Eine Reihe von Cumarinderivaten wird in der Klinik dazu verwendet, die Gerinnbarkeit des Blutes herabzusetzen und so die Gefahr von Thrombenbildungen zu senken. So gehören Cumarinderivate zu den bei Patienten mit Herzinfarkt häufig verwendeten Medikamenten. Bei dieser Antikoagulantientherapie kommt es nicht selten zu Blutungszwischenfällen aufgrund relativer Überdosierung des Cumarinderivates mit einem Absinken des Quickwertes über die erwünschte Grenze hinaus (MacDonald und Robinson, 1968). Dies kann einerseits durch eine Hemmwirkung eines gleichzeitig verabreichten Pharmakons auf den Cumarinabbau geschehen, andererseits aber auch dann auftreten, wenn eine Medikation abgesetzt wird, die den Arzneimittelabbau beschleunigt, z.B. Phenobarbital; unter diesen Umständen muß das Cumarinderivat höher dosiert werden, da es schneller abgebaut wird. Wenn nach Absetzen des Enzyminduktors nicht gleichzeitig die Cumarindosis dem nun wieder verlangsamten Arzneimittelabbau angepaßt, d.h. reduziert wird, können Blutungen auftreten (Kahl, 1971). Darüberhinaus können bei der Therapie mit Antikoagulantien vom Cumarintyp noch auf mehreren anderen Wegen Blutungszwischenfälle vorkommen (Koch-Weser und Sellers, 1971).

Da die Cumarinderivate im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle abgebaut werden, ist jedoch auch der umgekehrte Effekt, nämlich eine störende Wirkung der Cumarinderivate auf den Stoffwechsel anderer Arzneimittel, die dort abgebaut werden, anzunehmen. Dieses Problem verdient deshalb besonderes Interesse, weil Cumarinderivate zu den in der Klinik am häufigsten verwendeten Arzneimitteln gehören und eine große Zahl von

Interaktionen denkbar wäre. In klinischen Untersuchungen ist festgestellt worden, daß die Halbwertszeit von Tolbutamid (Solomon und Schrogie, 1967) bzw. der Blutspiegel von Diphenylhydantoin (Hansen et al., 1966) unter der Therapie mit Cumarinen ansteigt.

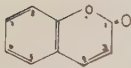
In tierexperimentellen Untersuchungen haben Christensen und Wissing (1972) sowie Deckert und Remmer (1972) nachgewiesen, daß einige gerinnungshemmende Cumarinderivate den Abbau von Modellsubstanzen in Rattenlebermikrosomen hemmen, während sie selbst an Cytochrom P-450 gebunden werden.

Auch in diesem Labor wurde von Weber der Einfluß von Cumarinderivaten, die klinisch zur Antikoagulantientherapie herangezogen werden, untersucht. Er verwendete bei seinen Versuchen Rattenlebermikrosomen als Enzymträger und p-Nitroanisol als Modellsubstrat. Dabei fand er einen deutlichen Hemmeffekt der Derivate auf den Abbau von p-Nitroanisol (1972).

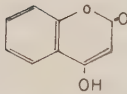
Aufgrund dieser Tatsachen war es interessant, die Wirkung von Cumarin selbst und solchen seiner Derivate, die nicht blutgerinnungshemmend wirken (4-Hydroxycumarin, 7-Hydroxycumarin, Cumarin-3-carboxylsäure und Cumarin-3-carbonsäureäthylester), zu untersuchen. Als Modellsubstrate dienten p-Nitroanisol, Amidopyrin und Anilin. Im Falle des p-Nitroanisolabbaues handelt es sich um eine O-Demethylierung, bei Amidopyrin um eine N-Demethylierung und bei Anilin um eine Hydroxylierung. Die Wirkung aller genannten Substanzen wurde anhand von arzneimittelabbauenden Enzymen aus Rattenlebermikrosomen untersucht.

## Z I E L   D E R   A R B E I T

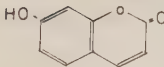
Strukturformeln der verwendeten Cumarinderivate



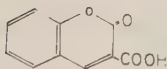
Coumarin



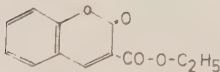
4-OH-Coumarin



7-OH-Coumarin



Coumarin-3-Carboxylsäure



Coumarin-3-Carbonsäureäthylester

Abb. 1

Die Wirkung verschiedener Cumarinderivate (Abb. 1) auf Reaktionen des oxydativen Arzneimittelabbaues soll in vitro untersucht werden. Als Modellreaktion für den oxydativen Arzneimittelabbau in der Mikroso-menfraktion der Leber werden die O-Demethylierung von p-Nitroanisol, die N-Demethylierung von Amidopyrin und die Ring-Hydroxylierung von Anilin ausgewählt (vgl. Abb. 2).

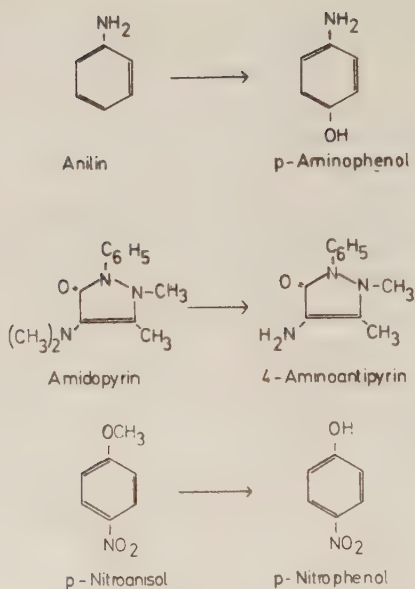


Abb. 2 Modellreaktionen für die Untersuchung des oxydativen Arzneimittelabbaus in Lebermikrosomen

1. Dabei soll am Beispiel der Demethylierung von p-Nitroanisol der Einfluß der Cumarine auf den Stoffwechsel eines sog. Typ I-Substrates untersucht werden. Bei dieser Modellreaktion werden für zwei Cumarinderivate, 4-Hydroxycumarin und 7-Hydroxycumarin, bei denen sich bereits eine Tendenz zur Hemmung der p-Nitroanisoldemethylierung erkennen läßt, sowohl die Substratkonzentrationen von p-Nitroanisol als auch die Konzentrationen der Hemmstoffe variiert.

Die Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von Substrat- und Hemmstoffkonzentration wird in doppelt reziproker Auftragung in Lineweaver-Burk-Diagrammen dieser beiden Cumarinderivate untersucht.

2. Die Wirkung der Cumarinderivate auf ein zweites sog. Typ I-Substrat haben wir am Beispiel der Amidopyrin-De-methylierung untersucht. Für dieses Substrat soll bei einer festen Hemmstoffkonzentration von  $10^{-4}$  M die Wirkung der verschiedenen Cumarinderivate untersucht werden. Als Amidopyrinkonzentration werden zwei Konzentrationen, 1 und 5 mM, ausgewählt.

3. Am Beispiel der Hydroxylierung von Anilin soll die Wirkung der Cumarinderivate auf den Stoffwechsel eines sog. Typ II-Substrates untersucht werden. Auch hier wird bei einer festen Hemmstoffkonzentration von  $10^{-3}$  M ein möglicher Hemmeffekt bei zwei verschiedenen Anilinkonzentrationen ( 1 und 4 mM ) untersucht.

## M A T E R I A L   U N D   M E T H O D E N

### 1. Pufferlösungen

Die Herstellung der Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4 und 7,8) erfolgte unter Verwendung zweier Stammlösungen (Stammlösung A: Monokaliumphosphat 0,067 M, Stammlösung B: Dinatriumphosphat 0,067 M). Für den Puffer mit dem pH-Wert von 7,4 wurden 19,7 ml der Stammlösung A und Stammlösung B ad 100 ml benötigt und für den Puffer von pH 7,8 7,4 ml der Stammlösung A und Stammlösung B ebenfalls ad 100 ml. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einer Glaselektrode der Firma Schott an einem Digitalmeter (Digi 610).

### 2. Substanzen

Folgende Verbindungen wurden untersucht (s. Abb. 1):

I. Cumarin (Fa. Merck)

II. 4-Hydroxycumarin (Fa. Schuchardt)

III. 7-Hydroxycumarin (Fa. Schuchardt)

IV. Cumarin-3-Carboxylsäure (Fa. Schuchardt)

V. Cumarin-3-Carbonsäureäthylester (Fa. Schuchardt)

Die genannten Substanzen wurden in 0,1 N NaOH aufgelöst.

### 3. Geräte

Die Extinktionsmessung bei der p-Nitroanisol-Demethylierung wurde am Spektralphotometer Beckmann DB-GT bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt (Lier, 1972).

Der Küvettenkasten wurde mit Hilfe eines Thermostaten der Fa. Lauda konstant auf 30° C temperiert. Die Extinktionszunahme wurde von einem Rikadenki-Schreiber aufgenommen (Rikadenki-Schreiber B-104).

Die Fluoreszenzmessungen bei der Amidopyrin-Demethylierung wurden an einem Photometer der Firma Eppendorf mit einem Anregungsfilter von 405-436 nm und einem Sperrfilter von 470-3000 nm gemessen.

Die Messung der Anilinhydroxylierung erfolgte ebenfalls an einem Spektralphotometer Beckman DB-GT bei einer Wellenlänge von 620 nm nach Bildung des Indophenolfarbstoffes (vgl. 9., S. 19). Die Ansätze wurden in einem Schüttelwasserbad der Fa. Köttermann bei 30° C inkubiert.

#### 4. Mikrosomenpräparation

Alle Versuche wurden in vitro an Kattenlebermikrosomen durchgeführt. 160-180 g schwere männliche Ratten (Sprague-Dawley) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion von 80 mg Phenobarbital-Na/kg Körpergewicht in 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung vorbehandelt. Den Ratten stand Altromin<sup>k</sup>-Trockenfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe) bis 12 Stunden vor der Tötung und Wasser ad libitum zur Verfügung. 20-24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Ratten durch Genickdislokation getötet und nach Durchtrennung der Halsgefäße gut ausgeblutet. Die Lebern wurden in situ durch die Pfortader mit einer 0-4° C kalten 0,9%igen NaCl-Lösung zwei bis drei Minuten lang perfundiert, um möglichst viele Erythrocyten herauszuwaschen. Anschließend wurden die Lebern entnommen und bei 0-4° C im Kälteraum gewaschen, auf das dreifache Gewicht mit einer sog. "SVT-Lö-

sung" (Leybold und Staudinger, 1959) (Saccharose 0,25 M, Versen 0,005 M, Tris-Puffer 0,02 M, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt) aufgefüllt und mit einem "Ultraturrax" (Fa. Jahnke und Kunkel) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 15 Min. bei 1 500 x g und danach 30 Min. bei 9 000 x g in einer Sorvall-Zentrifuge zur Sedimentation von Zelltrümmern und Mitochondrien zentrifugiert. Der 9 000 x g Überstand wurde in einer Spinco (L2 65 B) ultrazentrifuge (Fa. Beckman) bei 105 000 x g 60 Min. lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und erneut bei 105 000 x g 1 Stunde zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach der dritten Ultrazentrifugation bei 105 000 x g wurden die in der SVT-Lösung resedimentierten Mikrosomen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach der Proteinbestimmung wurden sie wieder aufgetaut, in versuchsgerechten Mengen auf Reagenzgläser verteilt und erneut bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

##### 5. Eiweißbestimmung nach Lowry

Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Das Prinzip der Eiweißbestimmung nach dieser Methode beruht darauf, daß Eiweiß in alkalischer Lösung mit dem Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu eine blaue Farbe ergibt, da das Reagenz mit phenolischen OH-Gruppen reagiert. Hierbei ist die Einwirkungs-dauer des Alkali von ausschlaggebender Bedeutung. Durch Zugabe von  $\text{Cu}^{++}$ -Salzen wird die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht. Die Bestimmung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 Mikroliter einer 1:10 verdünnten Mikrosomensuspension, 7 ml 10%ige  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, 1 ml 0,1%ige  $\text{CuSO}_4$ -Lösung und ein Milliliter Aqua bidest. wurden für den

Inkubationsansatz verwendet. Dieser blieb 30 Min. bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde 1 ml 1:4 verdünntes Phenolreagenz dazugegeben und anschließend für 5 Min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Extinktion in einem Eppendorf-Photometer (Filter 578 nm) gemessen. Als Standard diente Lab-Trol<sup>R</sup> (Dade Reagents, Inc., USA) mit einer Proteinkonzentration von 7 g/100 ml.

#### 6. NADPH-regenerierendes System und NADP<sup>+</sup>

Das NADPH-regenerierende System bestand aus Glucose-6-Phosphat (G-6-P), Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH) und  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP). Außerdem enthielten die Ansätze Nicotinsäureamid (Niacin).

60 mg G-6-P und 122 mg Niacin wurden gemeinsam in 6 ml Soerensen-Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 7,8 gelöst. G-6-P-DH wurde als 1 mg/ml-Suspension der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet, die enzymatische Aktivität betrug 140 U/ml. 0,56 U/ml Ansatz wurden in den Versuchen verwendet. Zur Herstellung einer NADP-Lösung wurden 30 mg  $\beta$ -NADP in Form des Dinatriumsalzes in 0,4 ml Aqua bidest. aufgelöst. Die Endkonzentration betrug für NADP 0,4 mM, für G-6-P 3,1 mM und für Niacin 13,3 mM.

#### 7. p-Nitroanisoldemethylierung

Das Modellsubstrat p-Nitroanisol wird zu p-Nitrophenol demethyliert. Das Demethylierungsprodukt p-Nitrophenol hat bei alkalischem pH eine gelbe Farbe, die sich spektrophotometrisch in Abwandlung der nach Netter und Seidel (1964) beschriebenen Methode bestimmen läßt.

Vor Versuchsbeginn wurde im Eiswasserbad eine 5 mg Protein entsprechende Menge Mikrosomen aufgetaut. Mit 0,4 ml G-6-P-Niacin-Gemisch, 0,02 ml G-6-P-DH, 0,25 ml p-NA  $2 \times 10^{-3}$  M und 4,33 ml Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,8) wurde ein 5 ml Ansatz hergestellt. Anschließend wurde dieser Ansatz mit Hilfe eines Reagenzglasvibrators sorgfältig durchmischt und zu gleichen Teilen auf zwei Küvetten verteilt. Die Substanzen lagen dabei in einem Volumen von 2,5 ml pro Küvette in folgenden Endkonzentrationen vor: 1 mg/ml Protein, G-6-P 3,1 mM, Niacin 13,3 mM, G-6-P-DH 0,56 U/ml und p-Nitroanisol  $1 \times 10^{-4}$  M.

Eine Küvette wurde im Eiswasserbad aufbewahrt, während die andere als Meßküvette im Küvettenkasten des Spektralphotometers von Beckman DB-GT bei 30° C 5 Min. äquilibriert wurde. In der Referenzküvette befand sich eine schwach gelbliche Pikrinsäurelösung. Sie diente als grober optischer Abgleich zwischen beiden Küvetten. Mit Hilfe der Nullpunktunterdrückung des Spektralphotometers wurde der genaue Abgleich vorgenommen. Allerdings wurde kurz vor Ende der Äquilibrierungszeit der Zeiger des Photometers nicht genau auf Null sondern etwa auf 0,1 Extinktionseinheiten eingestellt, um die anfängliche Extinktionsabnahme zu Beginn der Reaktion mitzuerfassen.

Mit 10 Mikroliter NADP, das zuvor auf einen Plastikspatel aufgebracht worden war, wurde die Reaktion gestartet. 15 Sekunden lang wurde das NADP sorgfältig in die Küvette eingerührt. Danach wurden Spektralphotometer und Schreiber gestartet und der Reaktionsverlauf während drei Minuten registriert. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Extinktionsverlauf wurde von einem Rikadenki-Schreiber B-104 mit einer

Geschwindigkeit von 10 mm/Min. und einer Verstärkung von 50 mV gemessen, so daß bei einem Meßbereich von 1 A die gesamte Schreiberbreite einer Extinktion von 0,5 Extinktionseinheiten entsprach. Nach drei Minuten Laufzeit wurden ebenfalls mit einem Plastikspatel 10 Mikroliter der Hemmstofflösung ( $10^{-4}$  M Endkonzentration) oder 0,1 N NaOH in der Kontrolle dazugegeben und die Extinktion weitere drei Minuten geschrieben. Anschließend wurde die zweite Küvette, die nach drei Minuten entweder Hemmstoff oder 0,1 N NaOH erhielt, aus dem Eisbad genommen und gestartet.

#### 8. Amidopyrindemethylierung

Bei der Amidopyrindemethylierung werden stickstoffständige Methylgruppen oxidiert und abgespalten. Der entstandene Formaldehyd wurde nach der Methode von Nash (1953) bestimmt.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde eine 25 mg Protein entsprechende Menge Mikrosomen im Eiswasserbad aufgetaut und zusammen mit 2 ml der G-6-P-Niacin-Lösung, 0,1 ml der G-6-P-DH Suspension und Amidopyrin in den Konzentrationen  $5 \times 10^{-3}$  M und  $1 \times 10^{-3}$  M in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Mit 0,067 M Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz durch Schütteln sorgfältig gemischt und im Eiswasserbad aufbewahrt.

Für die eigentliche Versuchsreihe wurden in einem Wasserbad von 30° C Schüttelbirnen vorbereitet, in denen sich folgende Ansätze befanden:

Leerwert: 0,5 ml Soerensen-Phosphatpuffer  
(pH 7,4)  
Kontrolle: 0,25 ml 0,1 N NaOH + 0,25 ml  
Puffer (Soerensen-Phosphatpuffer)  
Standard: 0,3 ml 0,1 N NaOH + 0,2 ml Form-  
aldehydstandard (25 Mikroliter  
Formaldehyd 35g/100g in 100 ml  
Aqua bidest. 1 : 10 verdünnt)  
Schüttelbirnen 1-8: 0,5 ml der Substanzen I-V

In alle Ansätze wurde 2 ml der oben genannten Mikro-  
somen-Suspension einpipettiert, so daß in jeder  
Schüttelbirne 2,5 ml Inhalt mit einem Proteingehalt  
von 1 mg/ml vorhanden war.

Nach 5 Min. Präinkubationszeit wurde die Reaktion  
mit 0,01 ml der oben erwähnten NADP-Lösung gestartet,  
so daß die Endkonzentration von NADP 0,4 mM betrug.  
Danach wurden die Schüttelbirnen im Wasserbad ge-  
schüttelt, um die Mikrosomen ausreichend mit Luft-  
sauerstoff zu versorgen.

Durch Pipettieren von jeweils 1 ml des Versuchsan-  
satzes in Zentrifugengläser mit 0,5 ml gesättigter  
 $\text{BaOH}_2$ -Lösung und 0,5 ml 5%iger  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung wurde  
die Reaktion nach 10 Min. gestoppt und für 10 Min.  
bei 2000 U/Min. zentrifugiert. 1 ml des Überstan-  
des wurde in vorbereitete Reagenzgläser mit 1 ml des  
Gemisches aus 20 Mikroliter Acetylaceton und 10 ml  
Ammoniumacetat pipettiert und für 30 Min. bei 60° C  
inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (10 Min.)  
wurde im Eppendorf-Photometer die Fluoreszenz mit  
dem Anregungsfilter 405-436 nm und dem Sperrfilter  
470-3000 nm gemessen.

Zur Ermittlung der entstandenen Formaldehydmenge aus der gefundenen Extinktion wurde eine Eichkurve verwendet, die unter Verwendung des Formaldehydstandards aufgestellt worden ist. Sie zeigte eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Formaldehydkonzentration.

7-Hydroxycumarin ließ sich mit dieser Methode nicht untersuchen, da die Substanz mit den Versuchslösungen zusammen eine Eigenfluoreszenz besaß.

## 9. Anilinhydroxylierung

Bei der Hydroxylierung an dem aromatischen Ring des Anilins entsteht p-Aminophenol. Aus dem p-Aminophenol wird ein Indophenolfarbstoff gebildet, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird (Brodie und Axelrod, 1948).

In einem Eiswasserbad wurde kurz vor Versuchsbeginn eine 20 mg Protein entsprechende Menge Mikrosomen aufgetaut und zusammen mit 1,8 ml des G-6-P-Niacin-Gemisches, 0,075 ml G-6-P-DH und Anilin in den Konzentrationen  $1 \times 10^{-3}$  M und  $4 \times 10^{-3}$  M in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,8) auf das Volumen von 16 ml aufgefüllt und im Eiswasserbad aufbewahrt.

In einem Wasserbad von 30° C wurden Schüttelbirnen mit folgenden Ansätzen vorbereitet:

Leerwert: 0,25 ml Soerensen-Phosphatpuffer  
(pH 7,8) + 0,25 ml 0,1 N NaOH

Standard: 0,2 ml Soerensen-Phosphatpuffer  
(pH 7,8) + 0,2 ml 0,1 N NaOH +  
0,1 ml p-Aminophenol (1,36 mg ge-  
löst in 50 ml Aqua bidest.)

Kontrolle: 0,25 ml Soerensen-Phosphatpuffer  
(pH 7,8) + 0,25 ml 0,1 N NaOH

Schüttelbirne: je 0,5 ml Hemmstofflösung (End-  
(4 - 7) konzentration im Ansatz 1 mM)

In jede Schüttelbirne wurde 2 ml des obigen Mikro-  
somenansatzes pipettiert. Es befand sich also in  
jeder Schüttelbirne ein Gesamtvolumen von 2,5 ml  
mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml.

Nach 10 Min. Präinkubationszeit wurde mit 0,01 ml  
NADP gestartet und weitere 20 Min. unter Schütteln  
inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion ge-  
stoppt, indem 2 ml des Ansatzes in neue Schüttel-  
birnen überpipettiert wurden, in denen sich 25 ml  
Äther und 0,5 g NaCl befanden. Dieser neue Ansatz  
wurde 15 Min. geschüttelt.

20 ml Ätherphase wurden anschließend in neue  
Schüttelbirnen abpipettiert und mit 3 ml einer  
1%igen Phenollösung in 0,1 N NaOH versetzt.

Nach weiteren 15 Min. Schütteln wurde der Äther-  
überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt,  
die Ansätze eine weitere Stunde unter dem Abzug  
stehen gelassen und dann bei 620 nm im Beckman-  
Photometer die Extinktion gemessen.

Zur Bestimmung der entstandenen p-Aminophenolmenge  
wurde eine Lichtkurve benutzt, die unter Verwendung  
von p-Aminophenol hergestellt worden war.

7-Hydroxycumarin ergab mit den Versuchslösungen einen anderen Farbton, so daß auf die Messung der Anilinhydroxylierung unter dem Einfluß von 7-Hydroxycumarin verzichtet wurde.

#### 10. Versuchsanordnung und statistische Auswertung

In den Versuchsreihen, in denen die Wirkung der Cumarinderivate auf den Fremdstoffumbau für eine konstante Substrat- und eine konstante Inhibitorkonzentration bestimmt werden sollte, wurde die Reihenfolge der zugesetzten Cumarinderivate bzw. der Natronlauge nach einem vorher festgelegten permutierenden Schema abgewechselt. In jeder Versuchsreihe wurden Mikrosomen verwendet, die mindestens drei unabhängigen Enzympräparationen entstammten.

Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mittels des nicht-parametrischen Verfahrens von Kruskal und Wallis (1952).

In den Abbildungen zu diesen Versuchen wurden die Einzelwerte der Ergebnisse dargestellt. Für die Zusammenfassung der Meßwerte in einer Gesamttabelle für alle untersuchten Modellreaktionen wurden die arithmetischen Mittelwerte und die einfache Standardabweichung nach Programmen des Institutes für Medizinische Statistik auf einer Programma 101 berechnet.

## ERGEBNISSE

### 1. Aktivität der p-Nitroanisoldemethylierung in Gegenwart von Cumarinderivaten

In Abb. 3 ist die Aktivität von Lebermikrosomen hinsichtlich der oxidativen Demethylierung von p-Nitroanisol unter dem Einfluß von 5 verschiedenen Cumarinderivaten untersucht worden.

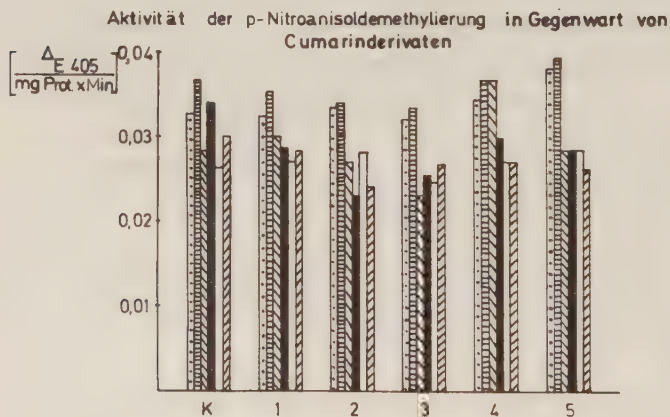


Abb. 3 Aktivität der p-Nitroanisoldemethylierung in Gegenwart von Cumarinderivaten  
Mikrosomen (1 mg Prot./ml) von phenobarbital-stimulierten männlichen Ratten wurden mit einem NADPH-regenerierenden System in Soerensen-Phosphatpuffer pH 7,8 bei 30° C inkubiert. Die Ansätze wurden 5 Min. präinkubiert und anschließend mit NADP gestartet.

Tabelle 1

Kritische Differenzen nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der pMA-Demethylierung in Gegenwart verschiedener Cumarinderivate

|                                  | Kontrolle | Cumarin | 4-Hydroxy-cumarin | 7-Hydroxy-cumarin | Cumarin-3-carboxylsäure | Cumarin-3-carbonsäure-äthylester |
|----------------------------------|-----------|---------|-------------------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle                        | 86,5      | 98,0    | 136,0             | 154,0             | 103,5                   | 88,0                             |
| Cumarin                          | -         | -       | -                 | -                 | -                       | -                                |
| 4-Hydroxy-cumarin                | 11,5      | 38,0    | -                 | -                 | -                       | -                                |
| 7-Hydroxy-cumarin                | 49,5      | 56,0    | 18,0              | -                 | -                       | -                                |
| Cumarin-3-carboxylsäure          | 67,5      | 5,5     | 32,5              | 51,5              | -                       | -                                |
| Cumarin-3-carbonsäure-äthylester | 17,0      | 10,0    | 48,0              | 66,0              | 15,5                    | -                                |

Nach 3 Min. wurde das jeweilige Cumarinderivat bzw. 0,1 N NaOH in der Kontrolle dazugegeben und weitere 4 Min. inkubiert. Die p-Nitroanisolkonzentration betrug  $10^{-4}$  M. Die Cumarinderivate wurden in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M verwendet. Übereinstimmend markierte Säulen stellen zusammengehörige Versuchsreihen dar. Es wurden Mikrosomen aus 3 verschiedenen Präparationen verwendet.

Die Cumarinderivate waren: 1.: Cumarin, 2.: 4-Hydroxycumarin, 3.: 7-Hydroxycumarin, 4.: Cumarin-3-carboxylsäure und 5.: Cumarin-3-carbonsäureäthylester.

Die mit K bezeichnete Säulengruppe stellt die Kontrollwerte dar.

Eine statistische Auswertung der Versuche in Abb. 3 ist in Tabelle 1 dargestellt.

Es handelt sich um eine nicht-parametrische Auswertung nach Kruskal und Wallis (1952). In diesem Test wurden die Ergebnisse der Versuche unabhängig von der experimentellen Variablen und von der Reihenfolge bei der Wiederholung nach der Größe des erzielten Umsatzes geordnet. Dabei wurde dem numerisch höchsten Wert die niedrigste und dem numerisch niedrigsten Wert die höchste Rangzahl zugeordnet. Die erste Reihe und die erste Spalte der Tabelle 1 geben die Rangsummen wieder, die sich für jede experimentelle Bedingung ermitteln ließen. In der Mitte der Tabelle sind die Differenzen zwischen den Rangsummen ohne Berücksichtigung des Vorzeichens aufgeführt. Die kritischen Differenzen erreichen in keinem Fall einen statistisch auffälligen Wert, der für diese Versuche ( $n=6$ ,  $k=6$ ) für  $p=0,05$  bei

zweiseitiger Fragestellung einen Wert von 104,0 hätte betragen müssen.

Durch die statistische Auswertung erscheint nachgewiesen, daß alle untersuchten Cumarinderivate in der verwendeten Konzentration von  $10^{-4}$  M die Demethylierung von p-Nitroanisol nicht erheblich beeinträchtigen.

Nach dem Eindruck, den Abb. 3 vermittelt, und nach den kritischen Differenzen in Tabelle 1 kommt ein gewisser inhibitorischer Effekt für 4-Hydroxycumarin und für 7-Hydroxycumarin in Betracht. Es wurden deshalb in weiteren Versuchen höhere Konzentrationen dieser beiden Cumarinderivate eingesetzt.

Lineweaver-Burk-Diagramm für 4-OH-Cumarin

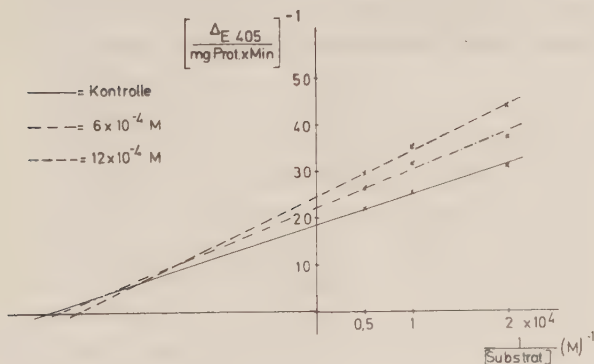


Abb. 4 Hemmung der p-Nitroanisoldemethylierung durch 4-Hydroxycumarin

Die reziproke Umsatzgeschwindigkeit wurde gegen die reziproke Substratkonzentration

in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Es wurden drei Substratkonzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M und  $0,5 \times 10^{-4}$  M) und zwei Inhibitorkonzentrationen ( $6 \times 10^{-4}$  M und  $12 \times 10^{-4}$  M) verwendet.

Die Inkubationsbedingungen entsprechen Abb.3

Abb. 4 stellt in einer doppeltreziproken Auftragung Versuche dar, in denen sowohl die Substratkonzentration von p-Nitroanisol als auch die Inhibitorkonzentration von 4-Hydroxycumarin variiert wurde. Mit zunehmender Hemmstoffkonzentration wird ein Hemmeffekt deutlich. Er ist jedoch auch bei der hohen Konzentration von  $12 \times 10^{-4}$  M des 4-Hydroxycumarin im Vergleich zu 7-Hydroxycumarin (s. Abb. 5) noch nicht sehr stark ausgeprägt. Aus dieser Darstellung wird deutlich, daß sich der Hemmeffekt nicht vollständig durch eine Erhöhung der Substratkonzentration aufheben läßt. Es liegt somit kein kompetitiver inhibitorischer Mechanismus vor.

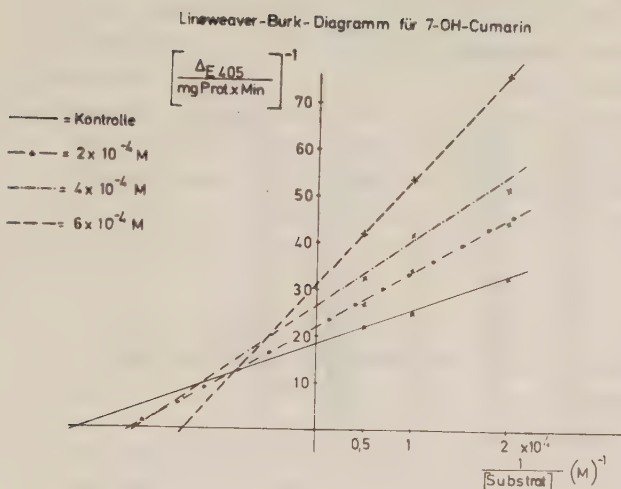


Abb. 5 Hemmung der p-Nitroanisoldemethylierung durch 7-Hydroxycumarin

Die reziproke Umsatzgeschwindigkeit wurde gegen die reziproke Substratkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Es wurden drei Substratkonzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M und  $0,5 \times 10^{-4}$  M) und drei Inhibitor-konzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  M,  $4 \times 10^{-4}$  M und  $6 \times 10^{-4}$  M) verwendet. Die Inkubationsbedingungen entsprechen Abb. 3

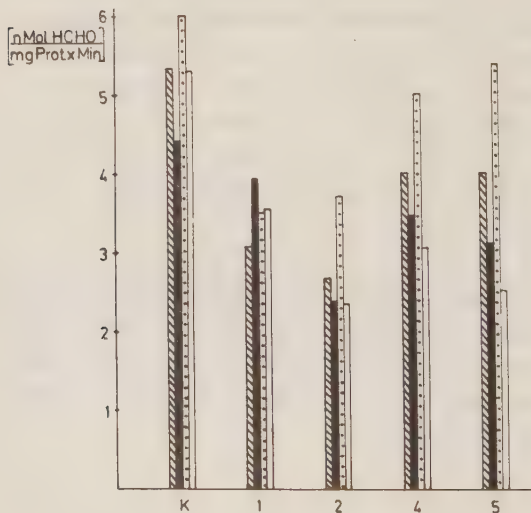
Abb. 5 zeigt in entsprechender Darstellung wie Abb. 4 einen deutlichen Hemmeffekt von 7-Hydroxycumarin, der schon durch niedrigere Hemmstoffkonzentrationen auszulösen ist, als sie für 4-Hydroxycumarin erforderlichlich waren (vgl. Abb. 4).

Bei einer Betrachtung der Wirkung von 4-Hydroxycumarin und 7-Hydroxycumarin in Abb. 3 bei einer Inhibitorkonzentration von  $10^{-4}$  M wird noch kein deutlicher Hemmeffekt und kein Unterschied zwischen den beiden Substanzen sichtbar. Durch die Variation von Substrat- und Inhibitorkonzentration, wie sie in Abb. 4 und 5 durchgeführt wurde, ergibt sich, daß 7-Hydroxycumarin von den beiden Cumarinderivaten die stärkere inhibitorische Wirkung besitzt.

## 2. Aktivität der Amidopyrindemethylierung in Gegenwart von Cumarinderivaten

Die Aktivität der Lebermikrosomen hinsichtlich des Umsatzes eines anderen Substrates ist in den Abb. 6a und 6b untersucht worden. Von den Cumarinderivaten wurde in den beiden Versuchsserien eine Konzentration von  $10^{-4}$  M eingesetzt; die Amidopyrinkonzentration betrug in Abb. 6a 1mM und in Abb. 6b 5mM.

Aktivität der Amidopyrindemethylierung in Gegenwart von Cumarinderivaten



Aktivität der Amidopyrimidemethylierung in Gegenwart  
von Cumarinderivaten

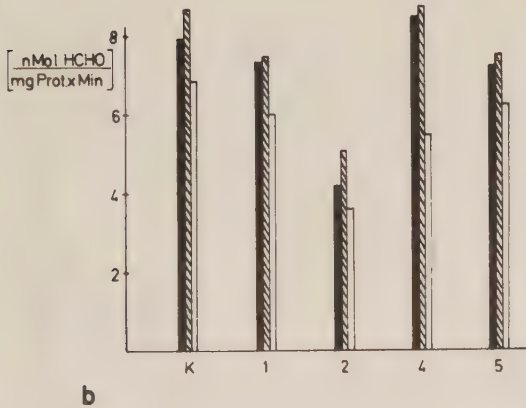


Abb. 6a und 6b

Aktivität der Amidopyrimidemethylierung in  
Gegenwart von Cumarinderivaten

Mikrosomen von phenobarbital-stimulierten männlichen Ratten wurden entsprechend Abb.3, jedoch bei einem pH von 7,4 inkubiert. Nach 5-minütiger Präinkubation mit dem entsprechenden Cumarinderivat bzw. 0,1 N NaOH in den Kontrollen wurden die Ansätze mit NADP gestartet und 10 Min. inkubiert. Die Bezeichnung der Säulen entspricht Abb. 3. Die Amidopyrimidinkonzentration betrug in den Versuchen der Abb. 6a 1 mM und in den Ver-

Kritische Differenzen nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Amidopyrindemethylierung in Gegenwart verschiedener Cumarinderivate

Tabelle 2a

|                                  | Kontrolle | Cumarin | 4-Hydroxy-cumarin | Cumarin-3-carboxylsäure | Cumarin-3-carbonsäure-äthylester |
|----------------------------------|-----------|---------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle                        | 14,0      | -       | 14,0              | 48,0                    | 56,0                             |
| Cumarin                          | 48,0      | 34,0    | -                 | -                       | 29,5                             |
| 4-Hydroxy-cumarin                | 56,0      | 42,0    | 8,0               | -                       | 42,5                             |
| Cumarin-3-carboxylsäure          | 29,5      | 15,5    | 18,5              | 26,5                    | -                                |
| Cumarin-3-carbonsäure-äthylester | 42,5      | 28,5    | 5,5               | 13,5                    | 13,0                             |

Tabelle 2b Kritische Differenzen nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Amidopyrindemethylierung in Gegenwart verschiedener Cumarinderivate

|                                  | Kontrolle Cumarin |      |      |      | 4-Hydroxy-cumarin |      | Cumarin-3-carboxylsäure |      | Cumarin-3-carbonsäure-äthylester |      |
|----------------------------------|-------------------|------|------|------|-------------------|------|-------------------------|------|----------------------------------|------|
|                                  | 14,0              | 23,5 | 42,0 | 17,0 | 23,5              | 42,0 | 17,0                    | 23,5 | 17,0                             | 23,5 |
| Kontrolle                        | 14,0              | -    | -    | -    | -                 | -    | -                       | -    | -                                | -    |
| Cumarin                          | 23,5              | 9,5  | -    | -    | -                 | -    | -                       | -    | -                                | -    |
| 4-Hydroxy-cumarin                | 42,0              | 28,0 | 18,5 | -    | -                 | -    | -                       | -    | -                                | -    |
| Cumarin-3-carboxylsäure          | 17,0              | 3,0  | 6,5  | 25,0 | -                 | -    | -                       | -    | -                                | -    |
| Cumarin-3-carbonsäure-äthylester | 23,5              | 9,5  | 0,0  | 18,5 | 6,5               | -    | -                       | -    | -                                | -    |

suchen der Abb. 6b 5 mM.

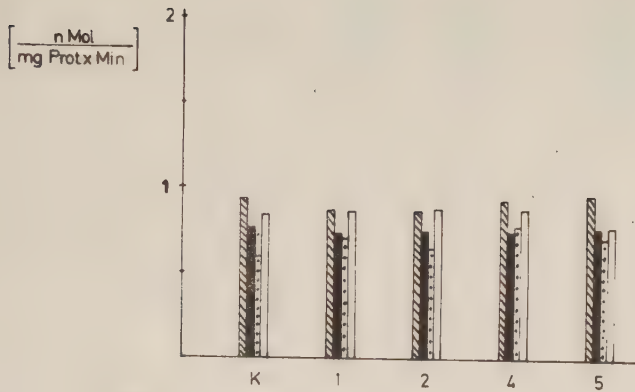
Die Cumarinderivate wurden in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M eingesetzt.

In Tabelle 2a ist die statistische Auswertung nach Kruskal und Wallis (1952) für die Versuche mit der niedrigeren Substratkonzentration und in Tabelle 2b für die Versuche mit der höheren Substratkonzentration wiedergegeben. Für ein  $p=0,05$  bei zweiseitiger Fragestellung müßte in Tabelle 2a ( $n=4$ ,  $k=5$ ) eine kritische Differenz von 45,6 und Tabelle 2b ( $n=3$ ,  $k=5$ ) eine Differenz von 29,9 überschritten werden. Dies ist in beiden Versuchsreihen nicht der Fall. Trotzdem zeigt sich eine Tendenz zu inhibitorischen Effekten, die bei der geringeren Amidopyrinkonzentration noch deutlicher ist. Diejenige Substanz, bei der die inhibitorische Tendenz am ausgeprägtesten erscheint, ist 4-Hydroxycumarin.

### 3. Aktivität der Anilinhydroxylierung in Gegenwart von Cumarinderivaten

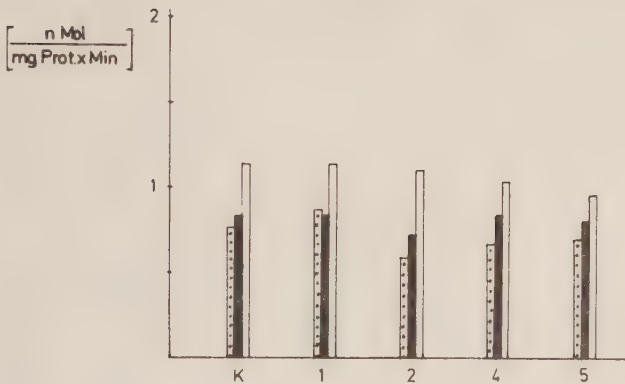
Der Umsatz von Anilin ist in den Versuchen der Abb. 7a und 7b unter dem Einfluß der Cumarinderivate untersucht worden. Die Cumarinderivate wurden in beiden Versuchsserien in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M eingegeben. Für die Anilinkonzentration von 1 mM (Abb. 7a) wie auch von 4 mM (Abb. 7b) wurde kein hemmeffekt der Cumarine deutlich.

Aktivität der Anilinhydroxylierung in Gegenwart von  
Cumarinderivaten



a

Aktivität der Anilinhydroxylierung in Gegenwart von  
Cumarinderivaten



b

Abb. 7a und 7b

Aktivität der Anilinhydroxylierung in  
Gegenwart von Cumarinderivaten  
Mikrosomen von phenobarbital-stimulierten

Kritische Differenzen nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Anilinderivate

Tabelle 3a

|                                  | Kontrolle |                   |                         |                                  |      |
|----------------------------------|-----------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|------|
|                                  | Cumarin   | 4-Hydroxy-cumarin | Cumarin-3-carboxylsäure | Cumarin-3-carbonsäure-äthylester |      |
| Kontrolle                        | 37,5      | -                 | 37,5                    | 46,5                             | 44,0 |
| Cumarin                          | 46,5      | -                 | 9,0                     | -                                | -    |
| 4-Hydroxy-cumarin                | 44,0      | 2,5               | 6,5                     | -                                | -    |
| Cumarin-3-carboxylsäure          | 38,0      | 8,5               | 0,5                     | 6,0                              | -    |
| Cumarin-3-carbonsäure-äthylester | 44,0      | 2,5               | 6,5                     | 0,0                              | 6,0  |

Kritische Differenzen nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Anilinhydroxylierung in Gegenwart verschiedener Cumarinderivate

Tabelle 3b

|                                  | Kontrolle | Cumarin | 4-Hydroxy-cumarin | Cumarin-3-carboxylsäure | Cumarin-3-carbonsäure-äthylester |
|----------------------------------|-----------|---------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle                        | 20,0      | 20,0    | 15,0              | 30,0                    | 27,0                             |
| Cumarin                          | 15,0      | -       | 15,0              | 30,0                    | 28,0                             |
| 4-Hydroxy-cumarin                | 30,0      | 10,0    | 15,0              | -                       | -                                |
| Cumarin-3-carboxylsäure          | 27,0      | 7,0     | 12,0              | 3,0                     | -                                |
| Cumarin-3-carbonsäure-äthylester | 28,0      | 8,0     | 13,0              | 2,0                     | 1,0                              |

Ratten wurden entsprechend Abb. 3 bei einem pH von 7,8 inkubiert. Nach 10-minütiger Präinkubation mit dem entsprechenden Cumarinderivat bzw. 0,1 N NaOH in den Kontrollen wurden die Ansätze durch NADP gestartet und über 20 Min. inkubiert. Die Bezeichnung der Säulen entspricht Abb. 3. Die Anilinkonzentration betrug in den Versuchen der Abb. 7a 1mM und in den Versuchen der Abb. 7b 4mM. Die Cumarinderivate wurden in einer Konzentration von 1mM eingesetzt.

Dies entspricht auch den Ergebnissen der statistischen Auswertung in den Tabellen 3a und 3b. Für eine statistisch auffällige kritische Differenz wäre für die Versuche der Abb. 7a in Tabelle 3a ein Wert von 45,6 ( $n=4$ ,  $k=5$ ) erforderlich (zweiseitige Fragestellung,  $p=0,05$ ); der entsprechende Wert für die Versuche in Abb. 7b müßte in Tabelle 3b 29,9 ( $n=3$ ,  $k=5$ ) betragen.

Da in den Tabellen 3a und 3b diese Grenzwerte bei weitem nicht erreicht werden, bestätigt auch die statistische Auswertung, daß für die untersuchten Substratkonzentrationen bei der verwendeten Cumarinkonzentration kein inhibitorischer Effekt nachweisbar war.

#### 4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuchsreihen mit konstanter Substrat- und Inhibitorkonzentration

Mittelwerte und Standardabweichung der Aktivität der untersuchten Modellreaktionen unter dem Einfluß der Cumarinderivate sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4

Aktivität der untersuchten Modellreaktionen in Gegenwart von Cumarinderivaten

|                                          | p-NA-Demethylierung<br>( $\Delta E_{405}$ /mgProt.x Min) | Amidopyridinemethylierung<br>( $\mu$ Mol HCHO/mgProt.x Min) | Anilinhydroxylierung<br>( $\mu$ Mol p-Aminophenol/<br>mg Prot.x Min) |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                                          | Substrat: 0,1 mM<br>Inhibitor: 0,1 mM                    | Substrat: 1 mM<br>Inhibitor: 0,1 mM                         | Substrat: 1 mM<br>Inhibitor: 1 mM                                    |
| Kontrolle                                | 0,031 $\pm$ 0,004                                        | 5,3 $\pm$ 0,9                                               | 7,9 $\pm$ 0,9                                                        |
| Cumarin                                  | 0,030 $\pm$ 0,003                                        | 3,5 $\pm$ 0,4                                               | 6,9 $\pm$ 0,8                                                        |
| 4-Hydroxy-<br>cumarin                    | 0,028 $\pm$ 0,005                                        | 2,8 $\pm$ 0,6                                               | 4,3 $\pm$ 0,7                                                        |
| 7-Hydroxy-<br>cumarin                    | 0,027 $\pm$ 0,005                                        | —                                                           | —                                                                    |
| Cumarin-3-<br>carboxyl-<br>säure         | 0,030 $\pm$ 0,004                                        | 3,9 $\pm$ 0,8                                               | 7,6 $\pm$ 1,8                                                        |
| Cumarin-3-<br>carbonsäure-<br>äthylester | 0,032 $\pm$ 0,005                                        | 3,8 $\pm$ 1,3                                               | 6,9 $\pm$ 0,6                                                        |
|                                          |                                                          |                                                             | 0,79 $\pm$ 0,12                                                      |
|                                          |                                                          |                                                             | 0,83 $\pm$ 0,15                                                      |

Die Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  die einfache Standardabweichung dar.

## D I S K U S S I O N

In den vorgelegten Untersuchungen wurde die inhibitorische Wirkung verschiedener Cumarinderivate in Inkubationsansätzen mit isolierten Rattenlebermikrosomen ausgetestet. Als Modellreaktion wurde die oxydative Metabolisierung von p-Nitroanisol, Amidopyrin und Anilin ausgewählt. Gegenüber diesen Substraten ließ sich eine unterschiedliche Wirkung der untersuchten Cumarinderivate nachweisen.

Bei Verwendung einer p-Nitroanisolkonzentration von  $10^{-4}$  M fand sich keine erhebliche Hemmwirkung der untersuchten Substanzen. Es wurde deshalb für zwei Substanzen, bei denen sich in Abb. 3 eine Tendenz zu einer schwachen Hemmwirkung abzeichnete, dieser inhibitorische Effekt unter veränderten Versuchsbedingungen deutlicher herausgearbeitet. In den Versuchen der Abb. 4 wurde für 4-Hydroxycumarin und in den Versuchen der Abb. 5 für 7-Hydroxycumarin unter systematischer Variation der Konzentration von p-Nitroanisol als des umzusetzenden Substrates sowie der des Inhibitors die Hemmwirkung näher analysiert. Dabei kam die inhibitorische Wirkung beider Cumarinderivate deutlich heraus. Eine Zuordnung zu den typischen Bildern einer kompetitiven oder nicht-kompetitiven Hemmung läßt sich auf Grund der beiden Lineweaver-Burk-Diagramme nicht treffen.

Gegenüber dem zweiten Substrat, Amidopyrin, kam der inhibitorische Effekt der Cumarinderivate unter den gewählten Inkubationsbedingungen (Abb. 6a und b) deutlicher als bei Verwendung von  $10^{-4}$  M p-Nitroanisol (Abb. 3) heraus. Ohne daß die statistische Auswertung bereits eine Signifikanz der Hemmwirkung für eines der

Cumarinderivate herausbringt, läßt sich erkennen, daß besonders bei der niedrigeren der beiden Amidopyrinkonzentrationen von 1 mM für alle untersuchten Cumarinderivate eine inhibitorische Beeinflussung der Modellreaktionen vorliegen könnte. Auch für das Substrat Amidopyrin läßt sich aus Abb. 6a und b erkennen, daß eine Erhöhung der Amidopyrinkonzentration zu einer Abschwächung der Hemmwirkung führt. Während in Abb. 6a bei Verwendung einer Amidopyrinkonzentration von 1 mM die Tendenz einer inhibitorischen Wirkung bei allen eingesetzten Cumarinderivaten erkennbar wird, kommt bei einer fünffach höheren Konzentration von Amidopyrin in Abb. 6b ein inhibitorischer Effekt nur noch für 4-Hydroxycumarin heraus. In wieweit die von Deckert und Remmer (1972) diskutierte Annahme zutrifft, daß durch die Abspaltung von Formaldehyd während der Demethylierung von Amidopyrin aus 4-Hydroxycumarin das inhibitorisch wirksamere Dicumarol synthetisiert wird, muß offen bleiben.

Keine Tendenz zu inhibitorischen Effekten der untersuchten Cumarinderivate läßt sich bei Verwendung von Anilin als Substrat in einer Konzentration von 1 und 4 mM feststellen. Möglicherweise wäre ein solcher Effekt bei weiterer Senkung der Anilinkonzentration noch sichtbar geworden.

In den Versuchen, in denen sich eine Tendenz zu inhibitorischen Beeinflussungen des oxydativen Metabolismus durch die verwendeten Cumarinderivate erkennen ließ, zeigte sich, daß die Substratkonzentration des zu metabolisierenden Fremdstoffes von Bedeutung war. Mit erniedrigter Substratkonzentration wurden die Hemmeffekte deutlicher. Dennoch konnte ein klarer kompetitiver Memmechanismus in den Lineweaver-Burk-Diagrammen

der Abb. 4 und 5 nicht festgestellt werden. Bei einem eindeutig kompetitiven Hemmechanismus hätte sich eine vollständige Aufhebung der inhibitorischen Wirkung bei maximaler Substratkonzentration zeigen müssen. In der doppelt-reziproken Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms hätte sich ein solcher Hemmtyp in einem Schnittpunkt der Geraden in dem Punkt der maximalen Umsatzgeschwindigkeit unter Kontrollbedingungen ohne Hemmstoff zeigen müssen.

Ein eindeutig kompetitiver Hemmtyp hätte an einen Mechanismus der Hemmwirkung denken lassen, bei dem die Cumarinderivate als konkurrierende Substrate in den Mikrosomenansätzen fungiert hätten. Dieses mikrosomale Enzymsystem kann chemisch sehr verschiedene Pharmaka und Fremdstoffe metabolisieren. Es weist damit eine hohe Unspezifität gegenüber den umsetzbaren Substraten auf. Da gleichzeitig **seine** Kapazität, Arzneimittel umzusetzen, nicht unbegrenzt ist, kommt es zu Veränderungen der Abbaugeschwindigkeit eines Pharmakons durch die Gegenwart eines zweiten. Solche gegenseitige Beeinträchtigung des Arzneimittelstoffwechsels durch die Gegenwart verschiedener abzubauender Pharmaka beansprucht auch klinisches Interesse. Wechselwirkungen, die sich auf der Ebene des Arzneimittelstoffwechsels in der Pharmakotherapie ergeben, sind z. B. von Kahl (1971) in einer Übersicht über die klinische Literatur dargestellt worden.

Von anderen Autoren sind die Hemmwirkungen anderer Cumarinderivate in vitro untersucht worden. Dabei wurden von Christensen und Wissing (1972) und Deckert und Remmer (1972) sowie in unserem Labor in der Dissertation von Weber (vorpubliziert: Huthwohl et al., 1972) Cumarinderivate untersucht, die in der Mehrheit

eine Verwendung in der Antikoagulantientherapie finden. Die in dieser Arbeit untersuchten Cumarinderivate haben keine Bedeutung als Memmstoffe der Prothrombinsynthese. Sie wurden im Vergleich zu den Cumarinderivaten, deren Hemmwirkung innerhalb mikrosomaler Präparationen bereits bekannt ist, unter der Frage untersucht, ob sich eine solche Hemmwirkung ohne erhebliche Unterschiede für beliebige Cumarinderivate nachweisen läßt. In den vorangegangenen Untersuchungen anderer Autoren hatte sich bereits eine unterschiedliche Ausprägung der Hemmwirkung der Cumarinderivate gezeigt. Bei allen Autoren erwies sich Dicumarol als der stärkste Inhibitor, wenngleich die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen keinen ganz eindeutigen Vergleich der Hemmeffekte zulassen. Christensen und Wissing (1972), aber auch Deckert und Remmer (1972) haben bereits 4-Hydroxycumarin als Grundkörper mit in ihre Untersuchungen einbezogen. Bei Christensen und Wissing (1972) ließ sich keine erhebliche Hemmwirkung von 4-Hydroxycumarin auf die Demethylierung von p-Nitroanisol, Amidopyrin und die p-Hydroxylierung von Anilin nachweisen. Unter den bei Christensen und Wissing (1972) gewählten Substrat- und Inhibitorkonzentrationen zeigten alle klinisch verwendeten Cumarinderivate eine deutliche Hemmwirkung. Die gleichen Autoren finden auch einen Unterschied zwischen den oxydativen Metabolismus hemmenden Substanzen und 4-Hydroxycumarin hinsichtlich der Beeinflussung der NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase. Von Gigon et al. (1969) wurde gezeigt, daß die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochrom P-450, die der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der Reaktionen des oxydativen Arzneimittelstoffwechsels sein könnte, durch sog. Typ I- und Typ II- Substrate unterschiedlich beeinflusst wird.

Christensen und Wissing (1972) finden eine Hemmung der NADPM-Cytochrom P-450-Reduktase durch die klinisch verwendeten Cumarinderivate, während 4-Hydroxycumarin die Reduktase nicht zu hemmen vermag. Bei Gigon et al. (1969) hatte sich eine Beschleunigung der Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochroms durch sog. Typ I-Substrate (entsprechend der Klassifikation von Schenkman et al., 1967) und eine Hemmung durch sog. Typ II-Substrate ergeben. Der Bindungstyp I bzw. II ergibt sich aus den Differenzspektren, die sich mit den Substraten innerhalb oxydiert gehaltener Mikrosomen messen lassen und die als ein Hinweis auf eine Interaktion der Inhibitoren und Substrate mit dem Cytochrom P-450 im Sinne einer Bindung an das Cytochrom interpretiert werden.

Christensen und Wissing (1972), Deckert und Remmer (1972) und Weber (1973) haben nachgewiesen, daß Cumarinderivate an das Cytochrom P-450 gebunden werden. Dabei zeigte sich bei Weber (1973), daß Cumarinderivate sowohl im Sinne des Typs I wie auch des Typs II gebunden werden. Die in ihrer Wirkung auf die Cytochrom P-450-Reduktase von Christensen und Wissing (1972) untersuchten Cumarinderivate gehörten zum Teil zu der Gruppe der Typ II-Substrate, zum anderen Teil ließ sich eine Klassifikation von diesen Autoren nicht durchführen. Weber (1973) konnte die von Christensen und Wissing (1972) in ihrem Bindungstyp nicht charakterisierten Cumarinderivate dem Typ II zuordnen. Mit Ausnahme von Dicumarol, für dessen Bindung Weber (1973) ein Differenzspektrum vom Typ I ermittelte, gehörten alle von Christensen und Wissing (1972) untersuchten Cumarinderivate dem Typ II an. Die Hemmung der Cytochrom-P-450-Reduktase durch die Typ II-gebundenen Cumarinderivate befindet sich in Übereinstimmung mit Gigon et al. (1969).

O'Reilly (1971) hat die Wechselwirkung verschiedener Cumarinverbindungen mit Plasmaalbumin von Mensch und Mund untersucht. Auch von diesem Autor wurden klinisch gebräuchliche Antikoagulantien mit 4-Hydroxycumarin und Cumarin verglichen, denen keine ausgeprägte bzw. keine antikoagulative Wirkung zukommt. Dabei zeigte sich, daß sich therapeutisch ausnutzbare Cumarinderivate von den weniger wirksamen oder unwirksamen Verbindungen durch die Bindungsstärke und die Zahl der Bindungsstellen am Albuminmolekül unterscheiden. Die Cumarine ohne einen antikoagulativen Effekt zeigten eine einzige Bindungsstelle am Albumin, während die klinisch gebräuchlichen Antikoagulantien zwei Bindungsstellen besaßen. Es könnte sein, daß die Seitenkette am Cumarinmolekül zu einer Intensivierung der Bindung und einer Bindung an einer zusätzlichen Stelle am Albuminmolekül führt und daß diese Faktoren etwas mit dem antikoagulativen Effekt zu tun haben. Im Hinblick auf unsere Untersuchungen zur Hemmwirkung von Cumarinderivaten könnte der Eiweißbindung der Cumarinderivate an Organproteine bei der Hemmwirkung auf den oxidativen Arzneimittelstoffwechsel ebenfalls eine Bedeutung zukommen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit, in denen sich keine erhebliche Hemmwirkung der Cumarinderivate zeigte, stützen im Zusammenhang mit den Ergebnissen von O'Reilly (1971), Christensen und Wissing (1972), Deckert und Remmer (1972) sowie Weber (1973) die Hypothese, daß die antikoagulative Wirkung über die Intensität der Eiweißbindung mit dem inhibitorischen Effekt auf den Arzneimittelstoffwechsel verknüpft ist.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Aktivität mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen wurde unter dem Einfluß von Cumarin, 4-Hydroxycumarin, 7-Hydroxycumarin, Cumarin-3-Carboxylsäure und Cumarin-3-Carbonsäureäthylester an isolierten Mikrosomenfraktionen der Rattenleber in vitro untersucht. Als Modellreaktionen wurden die Demethylierung von p-Nitroanisol, von Amidopyrin und die p-Hydroxylierung von Anilin gewählt.

Bei Verwendung relativ hoher Substratkonzentrationen ließen sich keine statistisch signifikanten Hemmwirkungen nachweisen. Eine Tendenz zu einer inhibitorischen Wirkung zeichnete sich in den Versuchen ab, in denen p-Nitroanisol und Amidopyrin als Substrate verwendet wurden. Für die Cumarinderivate 4-Hydroxycumarin und 7-Hydroxycumarin wurden deshalb Versuche durchgeführt, in denen die Konzentration von p-Nitroanisol als Substrat sowie die Konzentration der Inhibitoren variiert wurde. In Darstellungen nach Lineweaver-Burk wurde ein inhibitorischer Effekt ablesbar, der mit abnehmender Konzentration von p-Nitroanisol und zunehmender Konzentration der beiden Inhibitoren deutlicher herauskam. Eine Zuordnung der Hemmwirkung zu einem kompetitiven oder nicht-kompetitiven Hemmtyp ließ sich auf Grund der graphischen Auswertung nicht treffen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die untersuchten Cumarinkörper, denen nur eine sehr geringe oder keine antikoagulative Wirkung zukommt, nur eine schwach ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf die Fremdstoffumsätze ausüben.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- BILLING, B.H. and G.H. LATHE: The excretion of bilirubin as an ester-glucuronide, giving the direct van den Bergh reaction. Biochem.J. 63 6 (1956)
- BRODIE, B.B. and J. AXELROD: The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. J. Pharmacol. exp. Ther. 99 171 (1950)
- BRODIE, B.B. and J. AXELROD: The fate of acetanilide in man. J. Pharmacol. exp. Ther. 94 29 (1948)
- BRODIE, B.B. et al.: The fate of pentobarbital in man and dogs and a method for its estimation in biological materials. J. Pharmacol. exp. Ther. 109 26 (1953)
- BROWN, A.K., W.W. ZEULZER and H.H. BURNETT: Studies on the neonatal development of the glucuronide conjugating system. J. clin. Invest. 37 332 (1958)
- CHRISTENSEN, F. and F. WISSING: Inhibition of microsomal drug-metabolizing enzymes from rat liver by various 4-hydroxycoumarin derivatives. Biochem. Pharmacol. 21 975 (1972)
- COMMITTEE ON PROBLEMS OF DRUG SAFETY OF THE DRUG RESEARCH BOARD, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (ed.): Application of metabolic data to the evaluation of drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 10 607 (1969)

- CONNEY, A.H., E.C.MILLER and J.A.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes V.Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16 450 (1956)
- CONNEY, A.H. et al. : Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 130 1 (1960)
- CONNEY, A.H.: Enzyme induction by drugs in humans. *Federation Internationale Pharmaceutique*, 29<sup>e</sup> Congr. Internat. des Sciences Pharmaceutiques, Londres, 1-12 Sept. 1969
- COOPER, D.Y. et al.: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147 200 (1965)
- DECKERT, F.W. and H.K.REMMER: In vitro inhibition of rat and human liver microsomal enzymes by 4-hydroxycoumarin anticoagulants and related compounds. *Chem.-biol. Interactions* 5 255 (1972)
- DIXON, R.L., L.G.HART and J.R.FOUTS: The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 133 7 (1961)
- DIXON, R.L., R.W.SHULTICE and J.R.FOUTS: Factors affecting drug-metabolism by liver microsomes IV. Starvation. *Proc. Soc. exp. Biol.* 103 333 (1960)

- GILLETTE, J.R., B.B.BRODIE and B.N.LADU: The oxidation of drugs by liver microsomes. On the role of TPNH and oxygen. J.Pharmacol. exp. Ther. 119 532 (1957)
- GIGON, P.L., T.E.GRAM and J.R.GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. Mol.Pharmacol. 5 109 (1969)
- GRAHAM, W.D.: In vitro inhibition of liver aldehyde dehydrogenase by tetraethylthiuramdisulfide. J.Pharm. 3 160 (1956)
- HANSEN, J.M., M.KRISTENSEN and L.SKOVSTED: Dicumarol induced diphenylhydantoin intoxication. Lancet 1966/II, 265
- HUANG, C.L., F.L.SANDS and A.A.KURLAND: Paper chromatographic analysis of urinary chlorpromazine metabolites in psychotic patients. Clin.Chem. 7 573 (1961)
- HÜTHWOHL, B. et al.: Inhibition of microsomal drug metabolism by coumarin compounds. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 274 R57 (1972)
- ISSELBACHER, K.J.: Enzymatic mechanisms of hormone metabolism II. Mechanism of hormonal glucuronide formation. Rec.Progr.in Hormone Res. 12 134 (1956)

JONDORF, W.R., R.P.MAICKEL and B.B.BRODIE: Inability of newborn mice and guinea-pigs to metabolize drugs. Biochem.Pharmacol. 1 352 (1958)

KAHL, G.F.: Veränderungen der Abbaugeschwindigkeit von Arzneimitteln und ihre Bedeutung für die Pharmakotherapie. Klin.Wschr. 49 384 (1971)

KALOW, W.: Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase. J.Pharmacol.exp. Ther. 104 122 (1952)

KIESE, M.: Oxidation von Anilin zu Nitrobenzol im Hunde. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path. Pharmacol. 235 354 (1959)

KOCH-WESER, J. and E.M.SELLERS: Drug interactions with coumarin anticoagulants I. New.Engl.J.Med. 285 488 (1971)

KOCH-WESER, J. and E.M.SELLERS: Drug interactions with coumarin anticoagulants II. New Engl. J.Med. 285 547 (1971)

KRUSKAL, W.H. and W.A.WALLIS: Use of ranks in one criterion variance analysis. J.American Statistical Association 47 583 (1952)

LEYBOLD, K. und H.STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenleber-mikrosomen. Biochem.Zschr. 331 389 (1959)

LIER, A: Zur Frage der Beeinflussung des oxidativen und reduktiven Fremdstoffumbaus in den Mikrosomen der Rattenleber durch Metyrapon. Med.Diss. Mainz 1973

- LOWRY, O.H. et al.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 265 (1951)
- MACDONALD, M.G. and D.S. ROBINSON: Clinical observations of possible barbiturate interference with anticoagulation. J. Amer. med. Ass. 204 97 (1968)
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. Advanc. Enzymol. 19 79 (1957)
- MITOMA, CH. et al.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Arch.Biochem. 61 431 (1956)
- NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantusch-reaction. J. Biol. Chem. 55 416 (1953)
- NETTER, K.J.: Die Hemmung der Procainhydrolyse durch SKF-525-A und Trasentin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol. 235 498 (1959)
- NETTER, K.J.: Prinzipien des Arzneimittelabbaus im Organismus. Arzneimittelforsch. 12 1042 (1962)
- NETTER, K.J. and G.SEIDEL: An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. J. Pharmacol.exp.Ther. 146 61 (1964)
- OMURA, T. and R.SATO: A new cytochrome in liver microsomes. J. Biol. Chem. 237 1375 (1962)

- OMURA, T. et al.: Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450-reductase. Arch Biochem. Biophys. 117 660 (1966)
- O'REILLY, R.: Interaction of several coumarin compounds with human and canine plasma albumin. Mol. Pharmacol. 7 209 (1971)
- RAACKE, I. D.: The synthesis of proteins. In: D. M. Greenberg (ed.) Metabolic Pathways, Vol. 2 New York and London 1961 S. 263
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 235 279 (1959)
- REMMER, H. et al.: Drug interactions with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 2 187 (1966)
- SCHENKMAN, J. B., H. REMMER and R. W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 3 113 (1967)
- SOLOMON, H. M. and J. J. SCHROGIE: Effect of phenyramidol and bishydroxycoumarin on the metabolism of tolbutamide in human subjects. Metabolism 16 1029 (1967)
- TRÉFOUEL, J. et al.: Activité du p-aminophenylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. C. R. Soc. Biol. 120 756 (1935); zit.: H. Remmer, Internist 1 427 (1960)

WEBER, WERNER: ( Hemmung der p-NA-Demethylierung durch  
Cumarinderivate.) Med.Diss. Mainz 1973

WINTERS, W.D. et al.: Metabolism of thiopental-S<sup>35</sup> and  
thiopental-2-C<sup>14</sup> by rat liver mince and  
identification of pentobarbital as a major  
metabolite. J.Pharmacol.exp.Ther. 114  
343 (1955)

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl für  
die Überlassung der Dissertation, sowie für seine  
Ratschläge und Betreuung bei der Durchführung  
der Arbeit.

## LEBENS LAUF

Am 24.10.1948 wurde ich als Tochter des Dr. med. Franz Meis und seiner Ehefrau Ruth, geborene Mohnssen, in Erfurt geboren. Im Herbst 1955 wurde ich in die Grundschule in Erfurt eingeschult. Nach der Flucht meiner Eltern in die Bundesrepublik 1958 besuchte ich ab 1959 das Staatliche Gymnasium an der Burgstraße in Kaiserslautern. Dort legte ich am 19.6.1967 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967 begann ich an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz das Studium der Zahnheilkunde und bestand am 20.11.1972 die zahnärztliche Prüfung.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit führte ich im Jahre 1971 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz durch.









